

LCMS-8060 分析复杂生物样本的稳定性考察

LCMSMS-235

摘要: LCMS-8060 分析复杂生物基质血浆中小分子药物替比夫定和多肽药物奥曲肽, 替比夫定血药浓度 10 ng/mL, 奥曲肽血药浓度 50 pg/mL。日内和日间精密度结果符合《FDA 生物分析方法验证指导原则》。长期稳定性结果表明, 连续 1000 次进样的精密度, 替比夫定面积 RSD% 13.0, 替比夫定 -D3 面积 RSD% 4.9, 二者面积比 RSD% 10.4; 连续分析 900 针的精密度奥曲肽面积 RSD% 9.23, 内标亮丙瑞林 RSD% 7.45, 二者面积比 RSD% 9.25。结果表明 LCMS-8060 在复杂生物基质分析中稳定性好, 满足生物分析中大样本量长期分析。

关键词: LCMS-8060 替比夫定 奥曲肽稳定性

液质联用技术在药代动力学、临床检验、治疗药物分析等领域具有非常广泛的应用。在这些领域, 样本往往为基质较为复杂的生物样品, 例如血浆、血清、尿液、组织等。即使经过样品前处理过程, 提取液中依然含有丰富的蛋白、磷脂等物质, 尤其是采用简单蛋白沉淀方式处理样本。提取液进行 LC-MS/MS 分析, 容易造成系统污染。尤其是长期进行此类样品分析时, 提取液中含有大量蛋白、磷脂、盐等物质对 MS 电离源及离子传输通道的污染易造成灵敏度的下降, 表现为测量结果的稳定性不佳, 给准确测定药物浓度带来困扰。在复杂生

物基质分析中, 液质联用系统的良好的长期稳定性和优越的抗污染能力对分析结果的准确性非常关键。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用, 测试了血浆中 10 ng/mL 替比夫定样本 (以蛋白沉淀作为样品前处理方式) 和 50 pg/mL 奥曲肽样本 (以固相萃取作为样品前处理方式) 的日内和日间精密度, 以及连续分析一周的长期稳定性, 以此考察 LCMS-8060 应对复杂生物样本大通量分析的能力。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

1.2.1 替比夫定的分析条件

液相色谱条件

色谱柱: GL InertSustain C183.0×100 mm, 3.0 μm

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水溶液;

B 相 - 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 2 μL

自动进样器温度: 10°C

洗脱方式: 梯度洗脱 6 min, B 相初始浓度为 5%

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.10	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Controller	Stop	

质谱条件
离子源：ESI，正离子模式分析
加热模块温度：350°C
雾化气流速：3 L/min
干燥气流速：12 L/min
加热气流速：8 L/min

扫描模式：MRM
接口温度：250°C
驻留时间：100 ms
DL 温度：150°C
MRM 参数：见表 3

表2 化合物信息

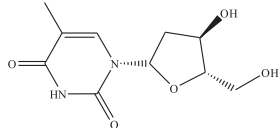
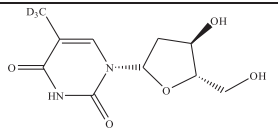
名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
替比夫定	Telvivudine	3424-98-4	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	
替比夫定-D ₃	Telvivudine-D ₃	/	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₅ CD ₃	

表3 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
替比夫定	243.10	127.10	-26.0	-10.0	-13.0
替比夫定-D ₃	246.10	130.10	-16.0	-9.0	-25.0

1.2.2 奥曲肽的分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Inertsil Sustain Swift C18 Column(2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；
B 相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

自动进样器温度：10°C

洗脱方式：梯度洗脱 5.5 min，B 相初始浓度为 18%

表4 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	70
3.60	Pumps	Pump B Conc.	90
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
4.10	Pumps	Pump B Conc.	18
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，正离子模式分析

加热模块温度：400°C

雾化气流速：3 L/min

干燥气流速：5 L/min

加热气流速：15 L/min

扫描模式：MRM

接口温度：380°C

驻留时间：50 ms

DL 温度：200°C

MRM 参数：见表 5

表5 化合物信息

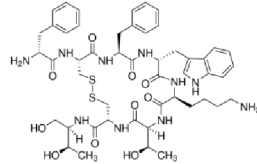
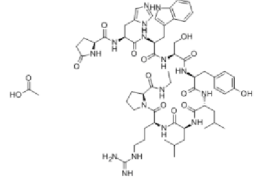
名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
奥曲肽	Octreotide	83150-76-9	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	
亮丙瑞林	Leuprolide	74381-53-6	C ₅₉ H ₈₄ N ₁₆ O ₁₂	

表6 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
奥曲肽	510.30	120.00	-20.0	-31.0	-20.0
	[M+2H] ²⁺	501.15	-20.0	-18.0	-34.0
亮丙瑞林	605.4	249.05	-22.0	-30.0	-28.0
	[M+2H] ²⁺				

1.3 样品制备

1.3.1 血浆替比夫定分析的前处理方法

样品配制：

1. 用纯水配制 1.0 mg/mL 替比夫定储备液，用纯水逐级稀释成浓度为 0.1 μg/mL、标准工作溶液。取 10 μL 标准工作曲线加入 990 μL 空白血浆中，配制成 10 ng/mL 血浆样品。

2. 用纯水配制 1.0 mg/mL 替比夫定 -D3 储备液，用纯水稀释至 100 μg/mL，配制成内标工作液。取 400 μL 内标工作液，加到试管中，加入 5600 μL 纯水，制得不含酶工作液。

样品前处理方法：

取 100 μL 血浆样品，加入 40 μL 含酶内标工作液，涡旋振荡 1 分钟，加入 200 μL 乙腈，13000 r/min 离心 5 分钟，取 200 μL 上清液进样分析，进样体积 2 μL。

6 天连续分析，进样 1000 针，考察 1000 针样品的替比夫定、替比夫定 -D3 的面积及两者面积比的日内和日间精密度。

1.3.2 血浆奥曲肽分析的前处理方法

样品配制:

1. 用纯水配制 1.0 mg/mL 奥曲肽储备液, 50% 甲醇逐级稀释成浓度为 2.5 ng/mL 标准工作溶液。取 20 μ L 标准工作曲线加入 980 μ L 空白血浆中, 配制成 50 pg/mL 血浆样品。
2. 用纯水配制 1.0 mg/mL 内标亮丙瑞林储备液, 50% 甲醇稀释至 4.0 ng/mL, 配制成内标工作液。

样品前处理方法:

1000 μ L 血浆样品加入 250 μ L 的内标溶液, 用 4% 磷酸稀释至 2250 μ L 后上样至预先活化好的 WCX SPE 小柱上, 先用 2000 μ L 5% 氨水溶液淋洗, 再用 2000 μ L 20% 乙腈淋洗, 最后用 250 μ L 1% TFA 75% 乙腈溶液洗脱, 加入 750 μ L 水稀释后, 10 μ L 上机分析。

6 天连续分析, 进样 900 针, 考察 900 针样品中奥曲肽、内标亮丙瑞林的面积及两者面积比的日内和日间精密度。

■ 结果与讨论

2.1 替比夫定分析的稳定性考察

2.1.1 典型色谱图

按照 1.3.1 的过程前处理 10 ng/mL 血浆样品, 处理后上机分析, 典型色谱图如图 1 所示。

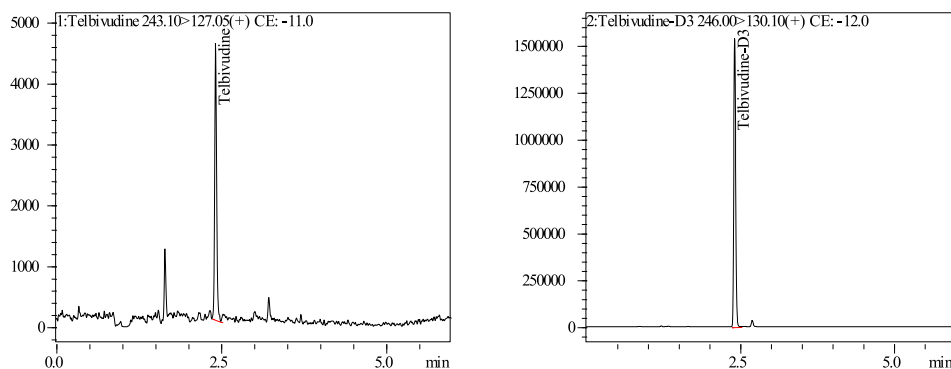


图1 10 ng/mL血浆样品替比夫定及同位素内标的典型色谱图

2.1.2 日内和日间精密度测试

本次分析根据 FDA 生物分析方法验证指导原则要求, : 1) 每个浓度水平的精密度测试至少重复 5 次; 2) 各浓度水平精密度不超过 15%; 3) 最低定量限的精密度不超过 20%; 日内和日间精密度均需考察。连续分析 10 ng/mL 替比夫定血浆样品 (以此浓度作为替比夫定的定量限), 考察 LCMS-8060 完成血浆中目标药物分析 3 天的日内精密度和日间精密度, 结果如表 7 所示。

表7 LCMS-8060日内和日间精密度

	替比夫定面积 RSD%	替比夫定-D ₃ 面积 RSD%	面积比 RSD%
日内精密度 (3 天日内精密度的最大值, 每天重复分析 6 个样品)			
LCMS-8060	3.8	4.6	3.7
日间精密度 (3 天日间精密度的最大值)			
LCMS-8060	3.7	3.6	2.7

2.1.3 长期稳定性 (一周内连续分析 1000 针)

为了考察 LCMS-8060 的长期稳定性, 测试了仪器连续 6 天共 1000 次进样的日内和日间精密度, 如表 6 所示, 结果显示 LCMS-8060 具有很好的稳定性。

表6 LCMS-8060连续6天日内和日间精密度实验结果

	样品数	替比夫定面积 RSD%	替比夫定-D ₃ 面积 RSD%	面积比 RSD%
1000 针样品进样分析, 日内精密度				
Day1	100	5.75	3.89	5.79
Day2	200	8.34	7.79	4.50
Day3	200	4.79	2.85	3.70
Day4	200	5.41	4.46	3.16
Day5	200	3.43	1.30	3.47
Day6	100	3.20	0.95	3.16
1000 针样品进样分析, 日间精密度				
Day1~Day6	1000	13.0	4.9	10.4

1000 针样品连续测定的峰面积统计图, 见图 2、3、4。

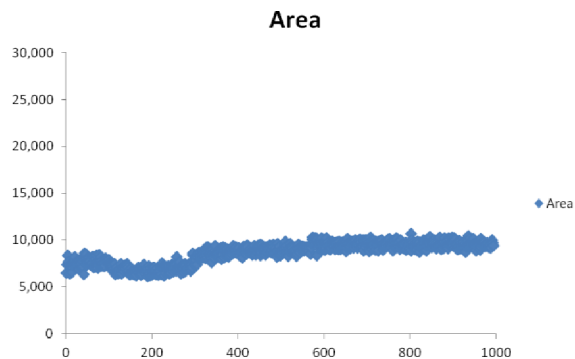


图2 1000针10 ng/mL血浆样品连续分析的峰面积变化趋势图

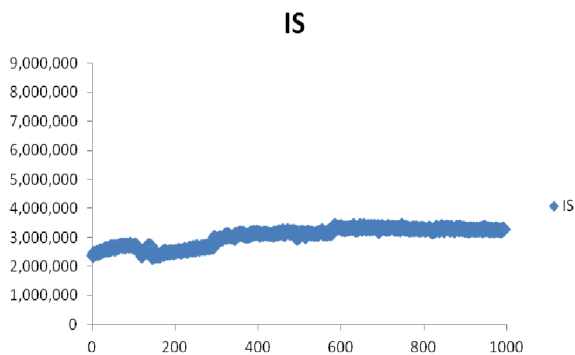


图3 1000针10 ng/mL血浆样品连续分析的内标峰面积变化趋势图

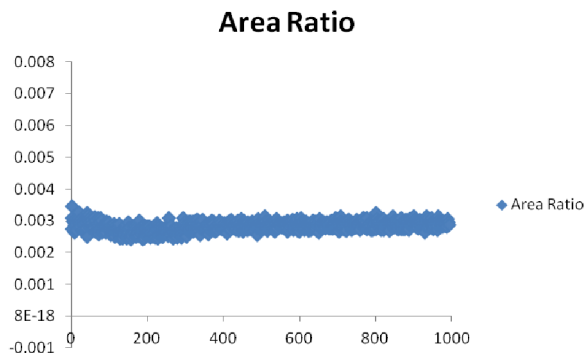


图4 1000针10 ng/mL血浆样品连续分析的替比夫定/替比夫定-D₃面积比变化趋势图

2.2 奥曲肽分析的稳定性考察

2.2.1 典型色谱图

按照 1.3.2 的过程前处理 50 pg/mL 血浆样品，处理后上机分析，典型色谱图如图 5 所示。

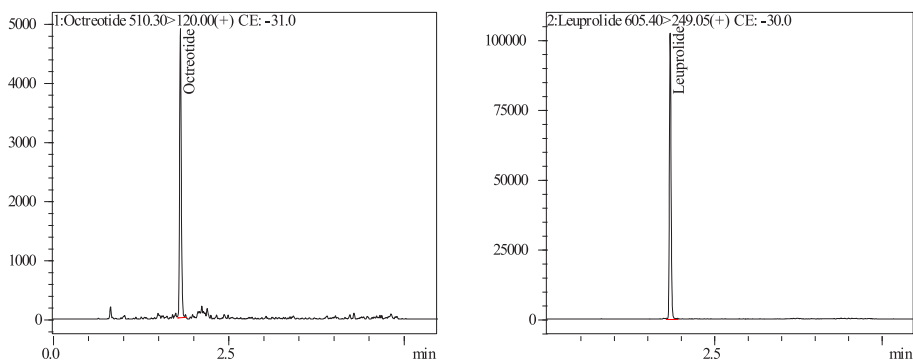


图5 50 pg/mL血浆样品奥曲肽及内标（亮丙瑞林）的典型色谱图

2.2.2 日内和日间精密度测试

本次分析根据 FDA 法规要求，连续分析 50 pg/mL 奥曲肽血浆样品（此浓度为奥曲肽质控最低点），样品分析 3 天的日内精密度和日间精密度，结果如表 7 所示。

表7 LCMS-8060日内和日间精密度

	奥曲肽峰面积RSD%	亮丙瑞林峰面积RSD%	峰面积比RSD%
日内精密度（3天日内精密度的最大值，每天重复分析 6 个样品）			
LCMS-8060	.94	8.60	6.00
日间精密度（3天日间精密度的最大值）			
LCMS-8060	7.12	6.93	7.29

2.2.3 长期稳定性（一周内连续分析 900 针）

为了考察 LCMS-8060 的长期稳定性，测试了仪器连续 6 天共 900 次进样的日内和日间精密度，如表 8 所示，结果显示 LCMS-8060 具有很好的稳定性。

表8 LCMS-8060连续6天日内和日间精密度实验结果

	样品数	奥曲肽峰面积RSD%	亮丙瑞林峰面积RSD%	峰面积比RSD%
1000 针样品进样分析, 日内精密度				
Day1	100	8.61	9.77	10.5
Day2	100	5.55	3.39	4.59
Day3	100	6.24	8.59	6.40
Day4	200	7.63	8.47	7.70
Day5	200	9.14	4.04	8.53
Day6	200	9.60	6.15	8.58
900 针样品进样分析, 日间精密度				
Day1~Day6	900	9.23	7.45	9.25

900 针样品连续测定的峰面积统计图, 见图 6、7、8。

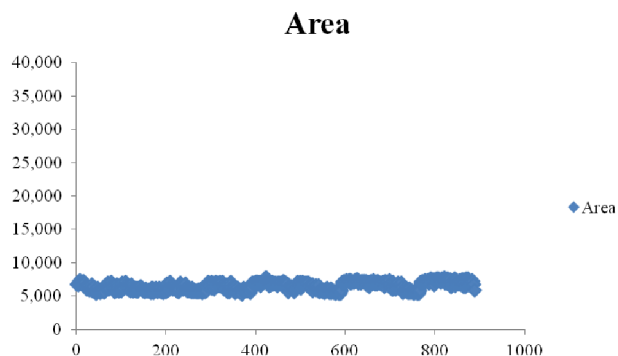


图6 900针50 pg/mL血浆样品连续分析的奥曲肽峰面积变化趋势图

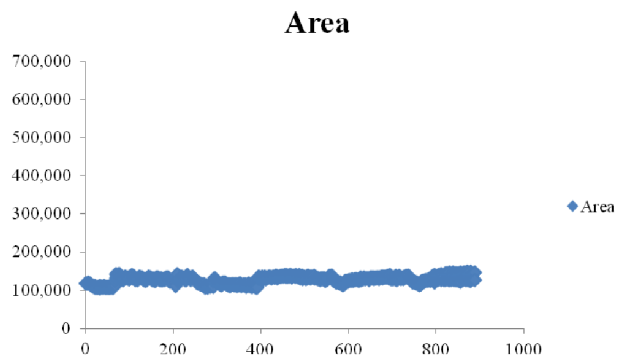


图7 900针50 pg/mL血浆样品连续分析的内标亮丙瑞林峰面积变化趋势图

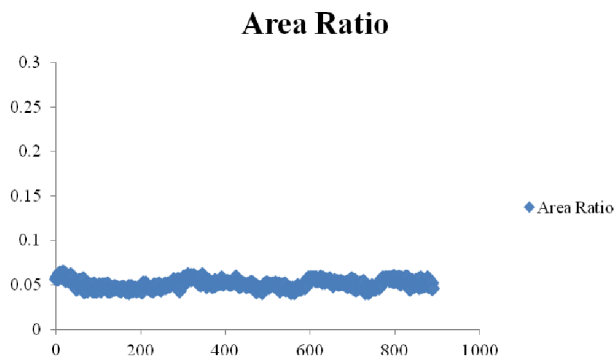


图8 900针50 pg/mL血浆样品连续分析的奥曲肽/亮丙瑞林面积比变化趋势图

■ 结论

利用 LCMS-8060 分析复杂生物基质血浆中小分子药物替比夫定和多肽药物奥曲肽，结果表明日内和日间精密度结果良好，完全符合《FDA 生物分析方法验证指导原则》对日内和日间精密度要求。长期稳定性结果表明，仪器连续分析 6 天共 1000 次进样的日内和日间精密度，替比夫定面积 RSD% 13.0，替比夫定 -D3 面积 RSD% 4.9，二者面积比 RSD% 10.4；仪器连续分析 6 天共 900 次进样的日内和日间精密度奥曲肽面积 RSD% 9.23，内标亮丙瑞林 RSD% 7.45，二者面积比 RSD% 9.25。以上结果表明 LCMS-8060 在复杂生物基质分析中稳定性好，满足生物分析中大样本量长期分析。